

Bevezetés

Végállapotú veseelégtelenségben (CRF) a vesepótló kezelés megteremtette a betegek rövidtávú túlélésének lehetőségét. Nem elég azonban a folyadék és elektrolit háztartás akut rendezésével elhárítani az életveszélyt. A CRF számos kórélettani elváltozást és állapotot takar, melyek az egyes szervrendszerek, kiemelten pedig a szív-érrendszer illetve a csontrendszer jellegzetes – egymással szorosan összefüggő - kórállapottaihoz vezetnek. Különösen fontos ezen eltérések felderítése gyermekkori CRF-ben, ahol a kóros állapot évekig, évtizedekig fennállhat, befolyásolva ezzel a betegek életminőségét és életkilátásait. Munkánkban ezen egymáshoz kapcsolódó, összetett, hálózatos folyamatok egy-egy szálának felgombolyítására vállalkoztunk.

A munkafolyamat, a kutatásban résztvevő személyek

A munkában kezdetben az I. Sz. Gyermekklinika Klinikai Nephrológiai Munkacsoport tagjai vettek részt. A második évtől új TDK hallgatók ill. PhD hallgatók kapcsolódtak a kutatásba. A nem-invazív kardiovaszkuláris (CV) monitorozás szívfrekvencia-variabilitásra (HRV) alapozott módszere mellé bevezettük a pulzushullám-terjedési sebesség (PWV) mérésén alapuló, az érfal merevséget vizsgáló eljárást. Az folyóiratokban közölt publikációs aktivitáson túli eredményeket ld. az 5. pont alatt.

A kutatás tudományos eredményei

Munkánk a következő fő kutatási irányokon alapult

1. Nem invazív CV monitorozás
2. A calcium- és foszfátanyagcsere vizsgálata
3. Olyan gén-polimorfizmusok együttes előfordulásának keresése, melyek ismertén, vagy feltehetően szerepet játszanak az urémiás szövődmények kialakulásában.
4. Állatkísérletes vizsgálat a vesetranszplantáció (Tx) során kialakuló ischaemiás-reperfúziós (I/R) károsodás jellemzésére.
5. Közleményeken túli, közvetett tudományos haszon

1. Nem-invazív CV monitorozás

E területen két módszert alkalmaztunk. A HRV módszert az urémiás autonóm idegrendszeri diszfunkció (AID) jellemzésére, valamint az új módszerként a PWV monitorozást az érfalmerevség vizsgálatára.

1.1. Az urémiás AID vizsgálata

Az urémiás AID hátterében metabolikus zavart és strukturális idegrendszeri eltéréseket feltételeznek. Korábbi vizsgálataink szerint gyermekkorban az AID reverzibilis és fokozott szimpatikotónussal is összefüggésben állhat. A HRV vizsgálatával pontosabban jellemeztük az egyes komponensek szerepét az autonóm diszfunkció kialakulásában.

1.1.1. HRV vizsgálatok

1.1.1.1 Az urémiás autonóm diszfunkció vizsgálata.

Gondozott, 5 és 30 év közötti hemodializált (HD) és vesetranszplantált (Tx) beteget vizsgáltunk. A betegek adatait korban illesztett, egészséges önkéntesekhez hasonlítottuk.

1.1.1.2. A szimpatikus aktivitás vizsgálata

Randomizált, kettős-vak, placebo-kontrollált vizsgálatban HD betegekben mértük meg az intravénás propranolol szívfrekvencia-variabilitásra gyakorolt hatását.

1.1.1.2. Megállapítások

A HRV alapján az urémiás autonóm idegrendszeri diszfunkció már gyermekkorban megfigyelhető. Az AID Tx gyermekekben és fiatal felnőttekben jelentős javulást mutat, a diszfunkció tehát reverzibilis.

A szívfrekvencia és a HRV kapcsolatának egészséges, hypertoniás és veseelégtelen gyermekekben való összehasonlításával megállapítottuk, hogy veseelégtelenségben a HRV csökkenése jelentős részben a szívfrekvencia emelkedésének a következménye. Ennek hátterében elsősorban a fokozott szimpatikotónus állhat.

A béta-blokád hatására bekövetkező HRV-növekedés alapján a szívfrekvencia-növekedéssel arányos HRV-csökkenés gyermekekben szimpatikotóniát, és nem neuropátiát tükröz urémiában.

1.1.2. A HRV-n alapuló vizsgálatokat – az Élettani Intézettel kooperációban - az artériás baroreflex (ABR) működésének vizsgálatával egészítettük ki. A ABR érzékenység jelentősen csökkent urémiában. Kevés irodalmi adat van vesebeteg fiatalokról, ezért urémiás gyermekek ABR működését és artéria carotis elaszticitását vizsgáltuk.

1.1.2.1. Megállapítások

HD fiatalokban a csökkent ABR részben a csökkent carotis tágulékonyág, részben pedig a károsodott cardialis vagus aktivitás következménye.

A Tx fiatal korban egyaránt képes megóvni ezektől a károsodásoktól, valamint helyreállítani a már csökkent baroreflex funkciót.

1.1.3. Elméleti – gyakorlati haszon

Elsőként mutattuk ki szimpatolitikum szívfrekvencia-variabilitást növelő hatását veseelégtelenségben. Eredményeink hozzájárulnak az urémiás AID patomechanizmusának jobb megértéséhez, és alapot nyújtanak racionális terápia bevezetéséhez.

1.2. A PWV vizsgálata egészséges és vesebeteg gyermekekben

Az érfal rugalmassága az életkor előrehaladtával fokozatosan csökken. E folyamat felgyorsul idült veseelégtelenségben (CRF), így gyermekkorban kialakuló CRF-ben is várható az érfalak merevebbé válása. A PWV a fal merevség progressziójával párhuzamosan nő, korai előrejelzője az arteriosclerosis kialakulásának.

1.2.1. Célkitűzés-betegek-módszer: a PWV korfüggő normál értékeinek meghatározása 6-23 éves korban, valamint urémiás gyermekek összehasonlítása illesztett egészséges kontrollcsoporttal. Vizsgáltunk néhány az érfali rugalmasság csökkenésének kialakulásában szereplő rizikó faktort is. A méréseket az applanációs tonometriás módszerrel elvén működő PulsePen készülékkel végeztük. Meghatároztuk a PWV-t, a serum kalcium (Ca), foszfát (P), valamint a parathormon (PTH)-szintet, elemeztük a dialízisbe eltöltött idő és a PWV alakulását.

1.2.2. Megállapítások

Az egészséges csoportban összefüggés találtunk a PWV valamint az életkor ($R=0.6$ $p<0.001$), a testmagasság ($R=0.49$ $p<0.001$) ill. a testsúly ($r=0.43$ $p<0.01$) között.

CRF-ben a PWV értéke átlagosan 5.68 ± 0.96 m/s, ami magasabb, de statisztikailag nem tér el a korban illesztett egészséges csoporttól (5.04 ± 1.15 $p=0.11$). Ugyanakkor testméret (testmagasság) alapján illesztett kontroll csoporthoz viszonyítva a különbség szignifikáns (4.56 ± 0.54 $p<0.003$). E kontrollcsoport életkora 4 évvel alacsonyabb a CRF-ben (14.5 ± 4 vs 9.9 ± 3 $p<0.01$), ami a testi fejlődés jelentős elmaradásból következik.

A PWV/testmagasság (PWV/h) paraméter a vizsgált korcsoportban korfüggetlen változó, ennek alapján jól elkülöníthető az egészséges és az CRF betegcsoport, ill. kiküszöbölhető növekedési elmaradás okozta torzítás.

CRF-ben magasabb P értéket, CaxP szorzatot és PTH szintet mértünk (mindhárom esetre $p < 0.02$). Összefüggést találtunk a Ca, P, PTH valamint a dialízisben töltött idő segítségével képzett „urémiás terhelés” paraméter és a PWV között.

1.2.3. Következtetés

CRF-ben a PWV értéke jelentősen meghaladta a testméretek alapján illesztett egészséges kontroll csoportét, ami fokozott CV kockázatra utal már e korcsoportban is. Eredményeink felhívják a figyelmet a Ca-P anyagcserének mint CV rizikófaktornak a szerepére. Fokozott figyelmet kell fordítani a gyermekkori normál kontroll csoportok kiválasztására, ill. lehetőség szerint korfüggetlen paramétereket kell alkalmazni.

2. A kalcium és foszfát anyagcsere vizsgálata urémiás és vesetranszplantált gyermekekben

Veseelégtelenségben a csont- illetve a calcium-foszfát anyagcsere szorosan összefügg a szív-érrendszeri szövődmények kialakulásával. Vizsgáltuk, hogy a rutin laboratóriumi mérések alapján milyen paraméterekkel jellemezhető legjobban a fokozott kalcifikáció urémiás gyermekeknél.

3.1. Betegek, módszer

12 krónikus urémiás gyermek (HD) és 24 transzplantált (Tx) gyermek paramétereit elemeztük. A kalcifikáció mértékét három megközelítésből kerestük: Ca x P szorzat, Ca-P aktivitási érték és CaHPO_4 vegyület koncentrációja. A CaHPO_4 koncentrációt komplexkémiai egyensúlyokból számítógépes modellel számítottuk a szérum elektrolitok és a pH alapján.

3.2. Eredmények

A Ca-, P- koncentráció valamint a CaxP szorzatot nem találtuk informatív paramétereknek, mert nem mutatják a szorzattényezők (Ca és P) együttes változásának irányát. A CaHPO_4 koncentrációját emelkedettnek találtuk a HD-ben és Tx előtt álló gyerekeknél (0.380 ± 0.173 mmol/l) az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva (0.260 ± 0.060 mmol/l).

Tx után 12 és 48 hónapban vizsgálva már normál értékeket találtunk.

Szoros negatív korrelációt mutattunk ki a HD-ben az iCa^{2+} és a PTH koncentrációk között ($r = 0.720$), míg Tx után ezt nem találtuk ($r = 0.122$).

3.3. Következtetések

Vizsgálataink alapján urémiás betegeknél nem célszerű különválasztani a Ca és a P szerepét, hiszen ezt az állapotot a komplexkémiai egyensúlyokból számolt CaHPO_4 vegyület reprezentálja leghűebben, mint minden primer kalcifikáció kiinduló anyaga.

3. Génpolimorfizmusok vizsgálata

A hősokk-proteinek egyik feladata a sejtfehérjék térbeli strukturájának helyreállítása különböző károsodásokat követően. A HSP70 hősokk-proteinek polimorfizmusai és a különböző noxiákat követő vesekárosodás mértéke között okozati összefüggés feltételezhető. A toll-like receptorok (TLR) a szervezet ősi, konstitucionális védekező mechanizmusának részét képezik. Szerepük lehet a kórokozók elleni akut védekezésben, emellett ismertek adatok veseátültetést követő reakciókban betöltött szerepükkel kapcsolatban.

Munkánkban részben az egyik leggyakoribb gyermekkori vesebetegségben, a húgyúti fertőzésben vizsgáltuk e rendszer szerepét, vizsgáltunk továbbá szerepüket egy nagyon speciális konstellációban, vesetátültetést (Tx) követően.

3.1. HSP 72 és TLR-4 szerepe a húgyúti fertőzések és a vesefibrózis kialakulásában

Gyermekkorban a bakteriális tubulointerstitialis nephritis a kónikus vesekárosodás egyik meghatározó tényezője. Szövődményként fibrosis, hypertonia, vesefunkció-romlás alakul ki. Megvizsgáltuk a HSP72 hősokk fehérje illetve a TLR 4 receptor ismert polimorfizmusai szerepét rekuráló húgyúti fertőzésben (UTI) szenvedő gyermekben.

3.1.1. Betegek és módszerek

103 visszatérő UTI miatt gondozott gyermek valamint 235 egészséges kontroll mintát vizsgáltunk. Vizsgált polimorfizmusok: HSPA1B A(1267)G és TLR4 A(896)G

3.1.2. Megállapítások

A HSPA1B (1267)G allél gyakrabban fordult elő húgyúti fertőzésben ($p=0.0001$) a HSPA1B (1267)GG genotípus pedig a vese hegesedés kialakulásának magasabb valószínűségével járt együtt ($p=0.036$).

A TLR4 (896)AG genotípus valamint a TLR4 (896)G allél előfordulása húgyúti fertőzésben szintén magasabb volt, mint a kontroll csoportban ($p=0.031$ és 0.041).

Adataink alapján, a HSPA1B (1267)G és a TLR4 (896)G allélek hordozása húgyúti fertőzésekre hajlamosítanak, függetlenül az egyéb rizikótényezők (anatómiai eltérések, pangás) meglététől.

3.1.3. Következtetések

Az eddigi gyakorlat alapján az anatómiai anomáliával rendelkező betegeket tartós antibiotikus profilaxisban részesítettük, míg a többieket nem. A most leírt új rizikófaktor a terápiás stratégia újragondolására készített.

3.2. A HSP 70 család és a TLR-ok szerepe a hosszútávú graft-túlélésben.

A hosszútávú graft túlélésben az immunológiai tényezők mellett szerepet játszanak a kezdeti, ischaemia-reperfüziós károsodás (I/R). A HSP70 protein család polimorfizmusai és az ischémiát követő vesekárosodás mértéke között okozati összefüggést feltételeznek. A HSP fehérjék egyik hatásmechanizmusa a TLR-en (Toll-like receptor) keresztüli citokin-felszabadulás szabályozása lehet.

3.2.1. Betegek, módszer.

Transzplantált betegekből két csoportot képeztünk: 15 évnél régebben transzplantált (Tx15), stabil betegek, ill. frissen transzplantált betegek. Kontrollként (C) egészséges véréradók vérmintája szolgált. A HSP72 A(1267)G, HSP73 A(190)C és TLR4 A(869)G polimorfizmusokat vizsgáltuk.

3.2.2. Megállapítások

HSPA1B (1267)AA ritkább volt Tx-ben mint Tx15- ben ($p<0.02$) ill a C csoportban ($p<0.004$).

HSPA1B (1267)GG gyakoribb volt Tx –ben ($p<0.005$ vs Tx15 ill. $p<0.002$ vs C).

TLR4 (299)AG ill a TLR4 (299)G prevalenciája magasabb volt Tx15-ben ($p<0.02$ vs Tx mindkét esetben)

3.2.3. Következtetések

A TLR4 299G allél szoros kapcsolata a hosszútávú grafttúléléssel arra utal, hogy ezen egyének proinflammatorikus válasza csökkent, ami akut rejekció elleni védelemhez vezethet. A HSP72 1267G variáns jelenléte a citoprotektív funkció és a graft túlélés közötti kapcsolatra utal. A HSP illetve a TLR polimorfizmusok előzetes feltérképezése támpontot adhat az individualizált immunosuppresszió megtervezésére, ill. a hosszútávú prognózissal kapcsolatban.

4. Állatkísérletes modell

Az ischémia okozta akut vesekárosodás meghatározó tényező a vesebetegségek mortalitásában. Az I/R-t akut tubuláris nekrosis gyakori jelenség Tx kapcsán.

Az ischémia során az ATP igényes folyamatok gátlódnak; köztük a szervezet homeosztázisát biztosító Na^+/K^+ ATPase (NKA) működése is. A reperfüzió alatt a felszabaduló oxigénradikálok citokinek (IL-2, IL-6) illetve endogén mediátorok (iNOS, ET) aktivációján keresztül a szöveti károsodást fokozzák. Nemi különbség tapasztalható számos szerv, így a szív, az agy illetve a bél ischémiás károsodásában. Korábban ischémiát követően

nőstényekben hosszabb túlélést, és az ischémiás noxa okozta enyhébb károsodásokat észleltünk mint hímekben. Az ischémia hatására a NKA eredeti helyéről a membrán-cytoskeleton komplexből kihelyeződik a cytosolba és csökken a pumpa aktivitása. A helyreállítás nem új proteinek szintézisének, hanem az eredeti molekulastruktúra rendeződésének következménye. Ebben a HSP 70 fehérjék chaperon funkciójának fontos szerepe lehet.

4.1. Célkitűzés

Kimutatható-e nemi különbség az I/R károsodást követően a NKA mRNS és fehérje expressziójában illetve pumpaaktivitásában?

4.2. Kísérleti protokoll

Ivarérett hím és nőstény Wistar patkányokon a bal oldali a. és v. renalist 55 percre lezorítottuk, az ellenoldali vesét eltávolítottuk. Három csoportot vizsgálunk. A kontroll csoportban ál-operált állatok, a második csoportban az I/R után 2 órával, a harmadik csoportban az I/R után 16 órával frakcionált leölést végeztünk.

Vizsgáltuk a NKA alegységeinek mRNS és fehérje expresszióját.

4.3. Eredmények

4.3.1. A HSP72 mRNA expresszió és a protein szint magasabb volt nőstényekben ($P < 0.05$).

4.3.2. A nőstényekben a NKA nagyobb hányada marad basolateralis pozícióban, míg hímeknél a NKA disztópiásan, apikálisan mutatható ki.

4.3.3. A HSP72 és NKA alpha(1) alegység elhelyezkedése azonos volt: nőstényekben elsősorban basolateralisan, hímekben a citoszolban és apikálisan volt kimutatható.

4.4. Következtetés

A nőstény vesében magasabb a bazális ill. postischémias HSP72 expresszió ami hozzájárulhat a NKA struktúra és funkció megőrzéséhez és ezzel a magasabb túlélési arányhoz.

5) A pályázat további közvetett „haszonnal” járt

A pályázat során hárman szereztek PhD fokozatot:

Fekete Andrea (témavezető: Dr. Reusz Gy)

Nemi különbségek és genetikai faktorok szerepe a vese iszkémiás/reperfúziós károsodásában (2004)

Tory Kálmán (témavezető: Dr. Reusz Gy)

A veseelégtelenségben kialakuló kardiovaszkuláris autonóm diszfunkció gyermekkori előfordulása és pathomechanizmusa (2004)

Dr. Károly Éva (témavezető: Dr. Reusz Gy, dr. Fekete A): Veseparenchyma laesio pathogenetikai tényezőinek vizsgálata húgyúti infectioval gondozott gyermekekben (2007)

A munkában kilenc TDK hallgató vett részt, TDK konferencián, hazai és nemzetközi kongresszuson adtak elő, rektori pályázatokat készítettek, társszerzői lettek közleményeknek (ld. Irodalomjegyzék), **kettő felvételt nyertek a Semmelweis Egyetem Doktori iskolájába**

(14975 karakter)

Melléklet

Nyilatkozat

A pályázat támogatásával Fekete Andrea elsőszerzőségével készült “Fekete A; Vannay A; Ver A; Rusai K; Muller V; Reusz G; Tulassay T; Szabo AJ: *Sex differences in heat shock protein 72 expression and localization in rats following renal ischemia-reperfusion injury*, Am J Physiol - Renal Physiol 291 (4): F806-11, 2006” közlemény köszönetnyilvánításában az OTKA-szám tévesen jelent meg. A helyes 046155 helyett Madácsy László 043178-as OTKA száma került a dolgozatba. Fekete A és Madácsy L (aki nem is társszerzője a közleménynek és abban semmilyen formában nem vett részt) igazolja a tévedést, ennek ellenére, a természetesen a dolgozatot nem szerepeltettem az OTKA támogatást feltüntető közlemények között

(705 karakter)